

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620121152352

UDC _____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

Clnk 在 TNF 诱导 L929 细胞死亡信号中的作用研究

Clnk plays a role in TNF- α -induced cell death in murine
fibrosarcoma cell line L929

徐 盟

指导教师姓名: 周化民 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 05 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

Clnk/MIST 在一系列细胞因子依赖的造血细胞系中表达，同时也在一些细胞因子非依赖的肥大细胞系中表达，并且能够与 PLC γ ，Grb2，ADAP 和 HPK-1 等蛋白相互作用。

作为 Blnk/SLP-76 接头分子蛋白家族的第三个成员，Clnk 参与免疫受体信号通路的正向调控。但是，在 Clnk 基因敲除鼠中，Clnk 对 T 细胞，NK 细胞和肥大细胞的正常分化和发育并不是必须的。

本论文发现了 Clnk 在免疫信号通路之外的一些功能。我们发现 Clnk 在一系列细胞因子非依赖的非造血细胞系中表达，比如 L929，B16F10，MCF7 和 HeLa 细胞。在 L929 细胞中，IL-2 和 TNF 的刺激并不能显著增加 Clnk 的转录水平，但是 Clnk 基因的失活却在一定程度上抑制了 TNF 诱导的细胞坏死。通过 NF- κ B 激活和 p38 磷酸化分析，我们发现 Clnk 不参与 TNF 诱导的细胞存活通路。进一步的研究表明，Clnk 缺失阻止了 TNF 诱导的 ROS 产生，同时，Clnk 很可能是 RIP3 坏死信号通路下游的重要调控蛋白，而且 Clnk 缺失阻止了 TNF 诱导的 MLKL 四聚体的形成和 MLKL 的上膜过程。另外，我们通过质谱技术，鉴定了两个和 Clnk 相互作用的蛋白 LBR 和 Ago2，并发现 Clnk 和 LBR 二者共定位于 HeLa 细胞的核膜上。同时，我们还发现 Clnk 参与了其他因子诱导的细胞死亡。

因此，作为一个接头蛋白，Clnk 除了介导免疫受体信号通路，还参与了 TNF 诱导的 L929 细胞死亡信号通路。

关键词：Clnk；MLKL；细胞坏死

Abstract

Clnk/MIST is expressed in a variety of cytokine-dependent hematopoietic cell lines as well as some cytokine-independent mast cell lines, and can interact with PLC γ , Grb2, ADAP and HPK-1.

As a third member of the Blnk/SLP-76 adapter family, Clnk is involved in the positive regulation of immunoreceptor signaling. However, Clnk is not essential for normal differentiation and function of T cell, NK cell, and mast cell from Clnk deficient mice.

Here we have found some functions about the Clnk protein beyond its primary role in response to immunoreceptor signaling. Specifically we provide findings that Clnk was expressed in a variety of cytokine-independent nonhematopoietic cell line such as L929, B16F10, MCF7 and HeLa. In L929 cell line, both IL-2 and TNF couldn't increase Clnk transcription level evidently, but disruption of *Clnk* gene conferred resistance to TNF-induced necrosis. Through NF- κ B activation and p38 phosphorylation analysis, we found that Clnk deficiency didn't affect survival pathway induced by TNF. And further research shows that Clnk deficiency blocked TNF-induced ROS generation, and simultaneously Clnk was most likely a key mediator of necrosis signaling downstream of the kinase RIP3, and Clnk deficiency blocked the generation of MLKL tetramer and the translocation of MLKL to the plasma membrane induced by TNF. In addition, through mass spectra technology, we identified two proteins LBR and Ago2 that interacted with Clnk, and we found Clnk and LBR both co-localized at nuclear envelope in HeLa cells. We also found that Clnk was involved in the cell death induced by other factors.

Therefore, Clnk, as an adaptor protein, may take part in TNF- α induced cell death in murine fibrosarcoma cell line L929 except mediating immunoreceptor signaling.

Keywords: Clnk;MLKL;necrosis

目 录

摘 要	I
Abstract.....	II
第一章 前言	1
1.1 肿瘤坏死因子 (TNF)	1
1.1.1 TNF 简介	1
1.1.2 TNF 能诱导不同的细胞死亡	1
1.1.3 TNF- α 诱导激活 NF- κ B.....	2
1.2 细胞死亡	3
1.2.1 细胞死亡的类型及定义.....	3
1.2.2 细胞凋亡	5
1.2.3 细胞坏死	6
1.3 SLP-76 接头分子家族	9
1.3.1 SLP-76 接头分子家族简介	9
1.3.2 Clnk	10
1.3.3 SLP-76	13
1.3.4 BLNK	13
1.4 立题背景	13
第二章 材料和方法	15
2.1 实验相关药品和试剂	15
2.2 DNA 相关实验和方法	15
2.2.1 质粒载体	15
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化	18
2.2.3 质粒 DNA 的提取	19
2.2.4 质粒 DNA 的工具酶处理	20
2.2.5 DNA 的回收和纯化	21
2.2.6 DNA 连接反应	21
2.2.7 PCR 相关实验	21

2.2.8 RNA 的提取与 RT-PCR.....	22
2.2.9 质粒载体的构建.....	23
2.3 细胞相关实验和方法.....	24
2.3.1 细胞培养.....	24
2.3.2 细胞转染.....	25
2.3.3 慢病毒包装与感染.....	27
2.3.4 细胞免疫荧光染色.....	28
2.3.5 利用流式细胞仪分析细胞存活率和 ROS 水平.....	28
2.4 蛋白质相关实验和方法.....	30
2.4.1 免疫共沉淀.....	30
2.4.2 免疫印迹.....	30
2.4.3 相关溶液配制.....	31
第三章 结果和讨论.....	33
3.1 TNF 抗性细胞株 Clnk^{mut} L929 细胞的获得.....	33
3.1.1 TNF 抗性细胞株 Clnk ^{mut} L929 细胞的筛选与鉴定.....	33
3.1.2 两株细胞对 TNF 的敏感性不同.....	33
3.1.3 Clnk 在两株细胞中的表达差异.....	34
3.1.4 细胞因子不能显著增加 L929 细胞中 Clnk mRNA 的转录水平.....	35
3.2 Clnk 在一系列细胞因子非依赖的非造血细胞中均有表达.....	38
3.3 Clnk 不参与 TNF 诱导的细胞存活通路.....	37
3.4 Clnk 调节 TNF 诱导的 L929 细胞的坏死.....	38
3.4.1 Clnk 参与 TNF 诱导的 L929 细胞死亡.....	38
3.4.2 Clnk 缺失阻止 TNF 诱导的 ROS 产生.....	39
3.4.3 Clnk 缺失阻断过表达 RIP3 导致的 L929 细胞坏死.....	40
3.4.4 Clnk 缺失阻止 TNF 诱导的 MLKL 的四聚体化和上膜.....	41
3.5 与 Clnk 相互作用的蛋白.....	44
3.6 Clnk 参与其他因子诱导的细胞死亡.....	46
3.7 总结与讨论.....	48
附录 1 图表索引.....	50
附录 2 缩略语及中英文对照.....	51

参考文献.....	55
-----------	----

致谢	63
----------	----

厦门大学博士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	II
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Tumor necrosis factor(TNF)	1
1.1.1 Introduction of TNF.....	1
1.1.2 TNF can induce different types of cell death.....	1
1.1.3 TNF- α induces NF- κ B activation.....	2
1.2 Cell death.....	3
1.2.1 Type and definition of cell death.....	3
1.2.2 Apoptosis.....	5
1.2.3 Necrosis.....	6
1.3 SLP-76 adaptor family	9
1.3.1 Introduction of SLP-76 adaptor family	9
1.3.2 Clnk	10
1.3.3 SLP-76	13
1.3.4 BLNK.....	13
1.4 Background of this thesis.....	13
Chapter 2 Materials and methods	15
2.1 Drugs and reagents	15
2.2 Experiments and methods for DNA.....	15
2.2.1 Plasmid vector.....	15
2.2.2 Preparation of competent cells and transformation	18
2.2.3 Preparation of plasmid DNA	19
2.2.4 Enzymatic treatment of plasmid DNA.....	20
2.2.5 Recovery and purification of DNA	21
2.2.6 Ligation	21
2.2.7 PCR experiments	21

2.2.8 Preparation of RNA and RT PCR	22
2.2.9 Constrution of plasmid vector.....	23
2.3 Experiments and methods for cell.....	24
2.3.1 Cell culture	24
2.3.2 Transfection.....	25
2.3.3 Lentivirus packaging and infection.....	27
2.3.4 Immunofluorescence staining	28
2.3.5 Analysis of cell survival rate and ROS by Flow Cytometer	28
2.4 Experiments and methods for protein	30
2.4.1 Co-immunoprecipitation	30
2.4.2 Western blot	30
2.4.3 Preparation of solutions	31
Chapter 3 Results and discussion.....	33
3.1 The preparation of the TNF-resistant L929 cell lines named Clnk^{mut} cells	33
3.1.1 The screening and identification of the TNF-resistant L929 cell lines named Clnk ^{mut} cells.....	33
3.1.2 Different sensitivities to TNF between two cell lines	33
3.1.3 The different expression levels of Clnk in two cell lines	34
3.1.4 Cytokines don't increase Clnk mRNA level evidently In L929 cell line	35
3.2 Clnk is expressed in a variety of cytokine-independent nonhematopoietic cell lines.....	36
3.3 Clnk deficiency does not affect survival pathway induced by TNF.....	37
3.4 Clnk modulates necrosis in L929 Cells	38
3.4.1 Clnk is involved in TNF-induced cell death in L929 cells	38
3.4.2 Clnk deficiency blocks TNF-induced ROS production	39
3.4.3 Clnk deficiency blocks the cell death of L929 induced by overexpression of RIP3	40
3.4.4 Clnk deficiency blocks the generation of MLKL tetramer and the translocation of MLKL to the plasma membrane induced by TNF	41
3.5 The proteins interacting with Clnk	44
3.6 Clnk is involved in the cell death induced by other factors	46
3.7 Conclusion and discussion	48

Appendix 1 Index of figures and tables	50
Appendix 2 Abbreviations.....	51
Reference.....	55
Acknowledgement.....	63

第一章 前言

1.1 肿瘤坏死因子 (TNF)

1.1.1 TNF 简介

1975 年, Carswell 等发现^[1], 经卡介苗 (BCG) 接种和细菌脂多糖 (LPS) 感染的小鼠血液中含有一种引起动物的肿瘤组织出血坏死的细胞因子, 该细胞因子能够杀伤体外培养的多种肿瘤细胞, 但对正常细胞则无毒害作用, 所以把这种物质称为肿瘤坏死因子 (Tumour Necrosis Factor, TNF)。

TNF 是一类可以直接杀伤肿瘤细胞并致其死亡的细胞因子。最早发现的 TNF 家族成员是 TNF- α 和 TNF- β , 其具有高度的序列同源性, 且在功能上也有一定程度的互补性^[2-4]。TNF- α 主要由巨噬细胞分泌, LPS 可诱导巨噬细胞产生高水平的 TNF- α ; TNF- β 主要由活化的 T 细胞产生, 抗原和丝裂原是诱导其产生的较强的激动剂。到目前为止, TNF 家族共有 21 个成员, 大部分都是跨膜蛋白。除了 TNF- β 外, TNF 其他的家族成员都能够形成同源三聚体^[5]。

TNF 家族具有多种生物学功能, 在炎症、免疫反应、细胞增殖、分化及死亡等多种生理或病理过程中都起到重要调节作用^[6, 7], 而这些功能都是通过 TNF 家族蛋白参与不同的信号通路实现的。

1.1.2 TNF 能诱导不同的细胞死亡

基于细胞类型和实验处理条件的不同, TNF 能够诱导不同的细胞死亡方式, 即 TNF 既能引起细胞凋亡, 也可诱导细胞坏死^[8, 9]。比如, TNF 刺激后, 能引起人乳腺癌细胞 MCF-7、杂交瘤衍生细胞 PC60 和横纹肌肉瘤细胞 KYM-1 等肿瘤细胞发生凋亡, 同时, TNF 也能引起小鼠成纤维细胞 L929 和小鼠纤维肉瘤细胞 WEHI-164 发生细胞坏死^[10, 11]。

虽然 TNF 诱导细胞死亡的信号通路极其复杂, 但其信号的传递过程都依赖于位于细胞膜表面的 TNF 受体 (TNFR)。目前已发现的 TNF 受体有 27 个, 比如 TNFR1, TNFR2, FAS, TRAILR 等, 构成了 TNF 受体超家族。该家族是一类跨膜蛋白, N 端在胞外, C 端在胞内, 在胞外部分具有多个典型的富含半胱氨酸的结构。以三聚体形式存在的 TNF- α 结合 TNF-R1 后, TNF-R1 寡聚化形成三

聚体而被激活,随后通过其死亡结构域(death domain, DD)迅速募集 TNFR1 相关的死亡结构域蛋白(TNF-R1-associated death domain protein, TRADD),而 TRADD 起到接头蛋白的作用,几分钟内便募集了更多的信号蛋白,如 RIP1 (receptor-interacting protein 1)、FADD (Fas-associated death domain protein) 和 TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) 等,这些蛋白将整合 TNF- α 传递的信息,并基于细胞内在特性和具体条件,进而决定细胞的死亡趋势和走向^[12-15]。

由于 TNF 能诱导不同类型的细胞死亡,所以 TNF 诱导的细胞死亡可作为研究细胞死亡机制的模型。

1.1.3 TNF- α 诱导激活 NF- κ B

转录因子 NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 在细胞质中以二聚体形式存在,并与抑制物 I κ Bs (NF- κ B inhibitors) 相互结合成为三聚物,该过程覆盖了位于 NF- κ B 上的入核信号,因此 NF- κ B 在胞质中是以无活性形式存在的。激酶 IKK (the I κ B kinase) 复合体由两个 I κ B 激酶 IKK α 、IKK β 和一个调节亚基 IKK γ /NEMO (NF- κ B essential modulator)^[16]组成。

当 TNF- α 与 TNFR1 结合后, TNFR1 复合体 (TRADD-RIP1-TRAF2) 上的 TRAF2 募集了 cIAPs-E3 泛素化连接酶,接着 cIAP1/2 (cellular inhibitor of apoptosis 1/2) 催化 RIP1 蛋白 Lys377 位的 Lys63 偶联的多聚泛素化^[17],而 RIP1 的多聚泛素化为转化生长因子 β 活化激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1), TAK1 绑定蛋白 2 (TAK1-binding protein 2, TAB2), TAK1 绑定蛋白 3 (TAK1-binding protein 3, TAB3) 提供了结合位点^[18]。同时, RIP1 的多聚泛素化链通过结合 IKK 复合体 (IKK complex, IKKs) 中的调节亚基 IKK γ /NEMO,而募集 IKK 复合体,随之, IKK 复合体中的 IKK β 被 TAK1 磷酸化而激活。激活的 IKK 迅速磷酸化位于胞质 NF- κ B 三聚物中的 I κ B,而磷酸化的 I κ B 接着被 E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin ligase) 识别而泛素化,导致其最终降解,从而脱离 NF- κ B,解除了其对 NF- κ B 二聚体的抑制^[19]。

摆脱 I κ B 抑制作用的 NF- κ B 暴露出自己的核定位信号,移位入核,进而结合到含有 κ B 位点的启动子上,作为转录因子发挥作用,提高一些抗凋亡基因的表达,如 cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins)、c-myc (myelocytomatosis oncogene)、TRAF1、TRAF2、Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2)、p53 和 p21。

因此，NF- κ B 的激活通常向细胞传递了抗凋亡的信号，有利于细胞的存活。

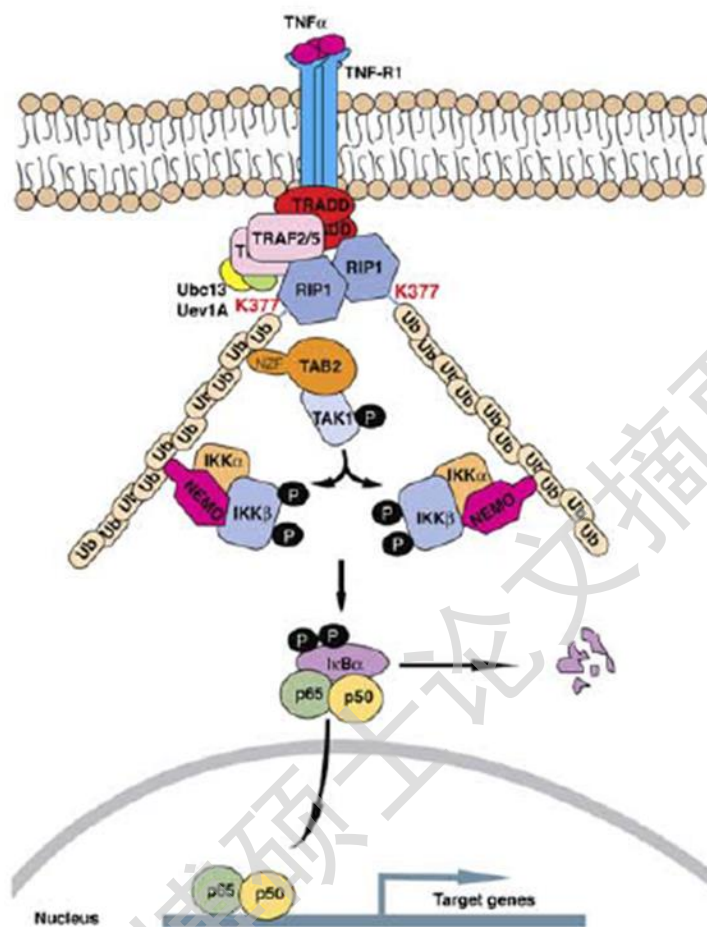


图 1.1 TNF- α 诱导激活 NF- κ B 的信号转导通路^[19]

Fig.1.1 TNF- α induced NF- κ B activation signaling pathway

1.2 细胞死亡

1.2.1 细胞死亡的类型及定义

细胞是生物体结构和功能的基本单位，经历着分裂、分化、衰老和死亡等过程。而细胞死亡在个体生长发育，正常生理及病理过程中起着至关重要的作用。根据其在形态学上的差异，可将细胞死亡方式分为细胞凋亡、细胞自噬性死亡和细胞坏死。

细胞凋亡的概念最早由 Kerr 等于 1972 年提出^[20]。细胞凋亡一词，即 apoptosis，源自古希腊语，意指花瓣或树叶的脱落、凋零。其生物学意义在于强调这种细胞

死亡方式是自然的生理学过程，是受基因调控的主动的生理性细胞自杀行为。凋亡细胞在形态学上主要表现为：（1）细胞伪足收缩，细胞变圆，体积变小；（2）染色质凝集，细胞核分裂成小块；（3）细胞以出芽方式形成内含完整细胞器及由细胞膜包裹的凋亡小泡；（4）凋亡小体被附近细胞或具有吞噬功能的细胞，如巨噬细胞等吞噬；（5）细胞凋亡过程中，细胞膜保持完整，没有细胞内容物的溢出和释放，故不会引起炎症反应（图 1.2-a）。

细胞自噬性死亡（autophage）的现象由 Ashford 和 Porter 于 1962 年首次在人肝细胞中发现^[21]。不同于细胞凋亡，自噬细胞细胞质内出现许多双层膜小泡，即自噬小体。强烈的细胞自噬现象是细胞自噬性死亡方式的标志性事件。但细胞自噬在应激状态下能够为细胞新陈代谢提供一定的物质和能量，并清除细胞内多余或不完整的细胞器；同时在一些条件下，比如营养缺乏时，能够促进细胞生存。可见，细胞自噬具有双重性，如何选择促进细胞存活还是死亡，是研究中急需解决的问题。

细胞坏死（necrosis）曾被普遍认为是一类由化学因素、物理因素和生物因素等环境因素伤害所引起的细胞被动的死亡现象。但在 1988 年 Laster 等用 TNF 处理一系列细胞系时，发现有的细胞出现了凋亡，有的细胞却发生了坏死^[9]。于是他们推测细胞坏死可能也依赖于某种遗传分子机制。随后若干年的研究结果进一步表明细胞坏死也可以被调控，即是一种程序性的细胞坏死。坏死细胞的主要特征有：（1）胞质透明化，线粒体、溶酶体、内质网等细胞器肿胀崩解；（2）核膜膨大，染色质发生固缩，成小块圆斑；（5）胞膜通透性增加，胞内水泡不断增大，细胞体积增大，发生肿胀直至最后破裂；（6）细胞膜破裂，细胞内容物流出，可引起周围组织的炎症反应（图 1.2-b）。

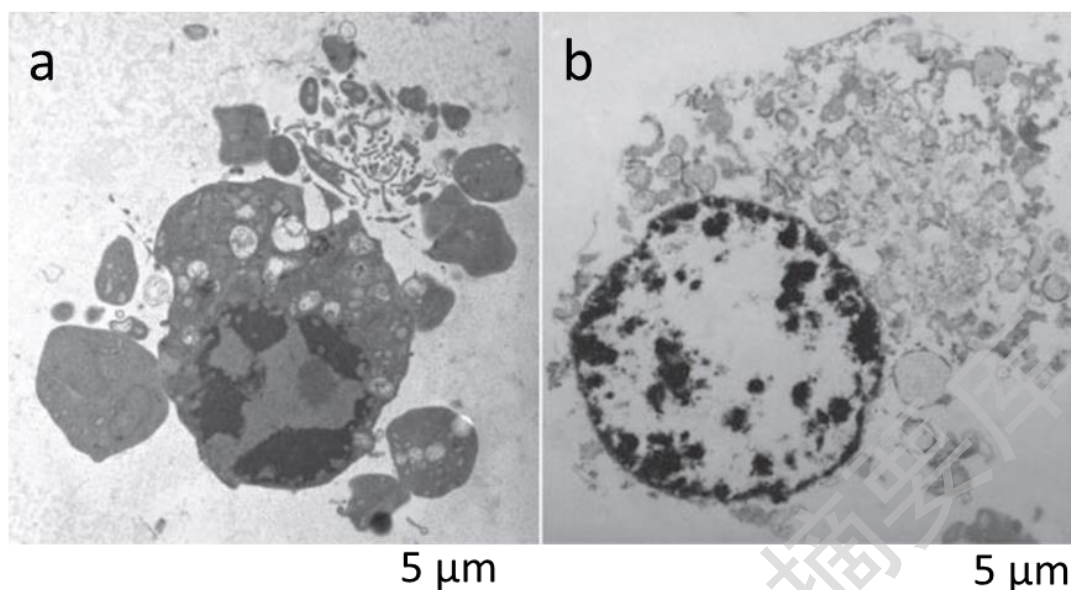


图 1.2 凋亡细胞 (a) 和坏死细胞 (b) 形态学上的差异^[22]

Fig. 1.2 The different morphology between apoptotic and necrotic cells

1.2.2 细胞凋亡

在三种细胞死亡类型中,细胞凋亡是迄今为止研究得最多最深入的一种类型,科学界对其发生机制和生理意义已有比较充分透彻的认识^[23]。

细胞凋亡过程中形态和生化方面的变化由胞内一系列天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶(caspase)来促成和执行^[24]。这些细胞凋亡蛋白酶在胞内刚合成时是以无活性的酶原形式存在,随后通过两种公认的细胞凋亡途径而被激活。

一种途径起始于线粒体,即内在途径。线粒体依赖型途径由位于线粒体上的 Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) 家族的促凋亡蛋白,如 Bak (Bcl-2 homologous antagonist / killer), Bax (Bcl-2 associated X protein) 和 BID (BH3-interacting domain death agonist) 来引发,这些蛋白的激活致使线粒体膜电势丧失和膜通透性增加,从而将线粒体中大量的细胞色素 c (cytochrome c) 和 Smac/Diablo 释放到细胞质中^[25]。细胞色素 c 随后结合细胞凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1), 形成 caspase-9 激活蛋白凋亡复合体,进而激活 caspase-9,并最终导致凋亡效应物 caspase-3/7 的切割和活化^[26]。Smac/Diablo 消除了 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) 对细胞凋亡蛋白酶的抑制作用,并促使 cIAP1 和 cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2) 的降解^[26-29]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.